

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE NANCY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Bernard ESTRAMAREIX

Ingénieur E.N.S.I.C. — Licencié ès-Sciences

Attaché de Recherches au C.N.R.S.

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude de la biogénèse de la thiamine.

2^{me} THÈSE. — Proposition donnée par la Faculté.
Les matériaux thermoélectriques modernes ;
Applications récentes de la thermoélectricité.

Soutenues le 1962 devant la Commission d'Examen.

Président M. S. DAVID

Examineurs { MM. J. AUBRY
R. GAY

1962

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE NANCY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Bernard ESTRAMAREIX

Ingénieur E.N.S.I.C. — Licencié ès-Sciences

Attaché de Recherches au C.N.R.S.

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude de la biogénèse de la thiamine.

2^{me} THÈSE. — Proposition donnée par la Faculté.
Les matériaux thermoélectriques modernes ;
Applications récentes de la thermoélectricité.

Soutenues le 1962 devant la Commission d'Examen.

Président M. S. DAVID

Examineurs { MM. J. AUBRY
R. GAY

1962



FACULTÉ DES SCIENCES

PREMIÈRE THÈSE

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DE LA BIOGÉNÈSE
DE LA THIAMINE

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. — Synthèse de la thiamine	15
CHAPITRE II. — Synthèse de la thiamine	25
CHAPITRE III. — Synthèse de la thiamine	35
CHAPITRE IV. — Synthèse de la thiamine	45
CHAPITRE V. — Synthèse de la thiamine	55
CHAPITRE VI. — Synthèse de la thiamine	65
CHAPITRE VII. — Synthèse de la thiamine	75
CHAPITRE VIII. — Synthèse de la thiamine	85
CHAPITRE IX. — Synthèse de la thiamine	95
CHAPITRE X. — Synthèse de la thiamine	105

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE	115
REMERCIEMENTS	125
ANNEXES	135

FACULTÉ DES SCIENCES

DOYEN : M. ROUBAULT

Assesseur : M. AUBRY

Doyens honoraires : MM. CORNUBERT, DELSARTE, URION

Professeurs honoraires : MM. GUTTON, CROZE, RAYBAUD, LAFFITTE, LERAY, JOLY, LAPORTE, EICHHORN, CAPELLE, GODEMENT, DUBREIL, L. SCHWARTZ, DIEUDONNE, de MALLEMANN, LONGCHAMBON, LETORT, DODE, GAUTHIER, GOUDET, OLMER, CORNUBERT, CHAPELLE, GUERIN, CHEVALLIER

Maîtres de conférences honoraires : MM. RAUX, LIENHART

PROFESSEURS

MM.	MM.
URION, Chimie biologique	LIONS, M.M.P.
DELSARTE, Analyse supérieure	SUHNER, Physique expérimentale
ROUBAULT, Géologie	HILLY, Géologie
VEILLET, Biologie animale	LE GOFF, Génie Chimique
ECHEVIN, Botanique	CHAPON, Chimie biologique
BARRIOL, Chimie théorique	HEROLD, Chimie industrielle
BIZETTE, Physique	SCHWARTZ, Exploit. minière
GUILLIEN, Electronique	GAYET, Physiologie
GIBERT, Chimie physique	MANGENOT, Phytopathologie
HERVE, Calcul dif. et intég.	MALAPRADE, Chimie
LEGRAS, Mécanique rationnelle	HADNI, Physique
DAVID, Chimie organique	DELAMARE-DEBOUTEVILLE, Zoolog.
BOLFA, Minéralogie	BONVALET, Mécanique physique
NICLAUSE, Chimie	Mme ROIZEN, Physique
FAIVRE, Physique appliquée	KERN, Minéralogie
AUBRY, Chimie minérale	BASTICK, Chimie
DUVAL, Chimie	DUCHAUFOUR, Pédologie
COPPENS, Radiogéologie	NEEL, Chimie ind. organique
FRUHLING, Physique	

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	MM.
WERNER, Botanique	VUILLAUME, Psychophysiologie
GARNIER, Agronomie	PLAN, Mécanique physique
REGNIER, Physico-chimie	Mme BASTICK, Chimie M.P.C. (Epinal)
WEPPE, Minéralogie appl.	GUDEFIN, Physique
BERNARD, Géologie	HORN, Physique
RENARD, Physique théor. et nucl.	CERF, Mathématiques générales
CONDE, Zoologie	FRENTZ, Biologie animale
GOSSE, Génie chimique	Mme HERVE, Math. (propédeutique)
CHAMPIER, Physique	AUROUZE, Paléontologie
GAY, Chimie biologique	FELDEN, Physique M.P.C. (Epinal)
ROCCI, Géologie	

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM.	MM.
MARI, Chimie (I.S.I.N.)	EYMARD, Math. (propédeutique)
LAFON, Physique (I.S.I.N.)	DANYSZ, Mécanique physique (I.S.I.N.)

Secrétaire Principal : M. CARON

FACULTÉ DES SCIENCES

Digitized by the Internet Archive
in 2026

AVANT-PROPOS

C'est sous la direction de Monsieur le Professeur S. DAVID que le présent travail a été effectué. Il a guidé nos premiers pas dans la recherche avec une bienveillante attention. Nous le prions d'accepter l'expression de notre profonde reconnaissance.

Nous remercions vivement Messieurs les Professeurs J. AUBRY et R. GAY qui ont bien voulu faire partie de notre jury et Monsieur le Professeur LEDERER qui nous a fait l'honneur d'accepter de nous parrainer au Centre National de la Recherche Scientifique.

Heureux d'en trouver ici l'occasion, nous adressons nos remerciements à tous ceux qui ont facilité notre travail par leur aide précieuse et en particulier:

Monsieur CHEVALLIER dont l'expérience en bactériologie nous a été souvent indispensable.

Messieurs les Professeurs WOLFF, DE LAVERGNE et PAYSANT de la Faculté de Médecine de Nancy qui ont mis si aimablement à notre disposition les appareils de leur laboratoire.

Monsieur Paul LEHR dont la collaboration a été fructueuse.

Nous tenons enfin à témoigner notre gratitude à Monsieur le Directeur du Centre National de la Recherche Scientifique pour l'aide qu'il nous a accordée en nous acceptant au sein de cette Communauté Scientifique.

INTRODUCTION

Dans une quarantaine de publications sur la biogénèse de la thiamine (I), on n'a examiné que l'aptitude de divers organismes soit à combiner le fragment thiazole (II) et un dérivé approprié tel que (III, $R=CH_2OH$) du fragment pyrimidique, soit à se passer de l'un ou de l'autre de ces deux fragments. Les structures (II) et (III) sont exceptionnelles en biochimie. Cette singularité a une valeur de traceur. Si elles peuvent remplacer la thiamine comme facteur de croissance, c'est très probablement parce qu'elles sont incorporées presque inchangées dans sa molécule. Ceci est confirmé par l'administration des précurseurs (II) et (III, $R=CH_2=NH_2$) sous une forme radioactive qui conduit à la formation de thiamine radioactive (1). Les détails du mécanisme de la condensation se précisent peu à peu (2). Les résultats les plus récents semblent indiquer que l'azote d'un ester phosphorique du thiazole (II) se quaternise par attaque nucléophile sur l'ester pyrophosphorique de la pyrimidine (III, $R=CH_2O-PO(OH)-O-PO_3H_2$).

Les études biogénétiques avec des précurseurs moins évidents des deux fragments de la thiamine sont plus rares. Le soufre 35 de la méthionine se retrouve dans le thiazole de la thiamine du foie de rat (3), mais il est peut-être passé intermédiairement par une combinaison minérale. Les autres recherches sont d'ordre microbiologique. On examine si le précurseur peut remplacer le thiazole (II) et permettre la croissance d'un microorganisme incapable d'en faire la synthèse. Il est difficile de tirer des conclusions de l'ensemble des données publiées. On rapporte un effet favorable de la méthionine avec *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens* (4), un mutant de *Neurospora crassa* (5), *Mucor racemosus*, et dans certaines conditions, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces saké* (6) d'une part, mais d'autre part un effet nul avec *S. saké*, *Candida utilis* (7), avec des mutants de *Escherichia coli*, *Neurospora crassa* (8) et *Salmonella typhimurium* (9). Les radicules de pois isolées convertissent en thiazole de la thiamine la β - (méthyl - 4 thiazolyl - 5) alanine où l'on reconnaît le squelette de la méthionine. C'est d'ailleurs là un mode classique de la dégradation des acides aminés par les levures. Mais ce composé est inactif vis-à-vis de *Phycomyces blakesleeana*, *Staphylococcus aureus* (11) et d'un mutant de *Neurospora crassa* (12).

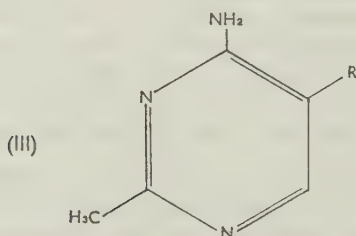
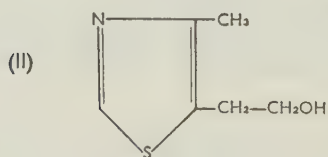
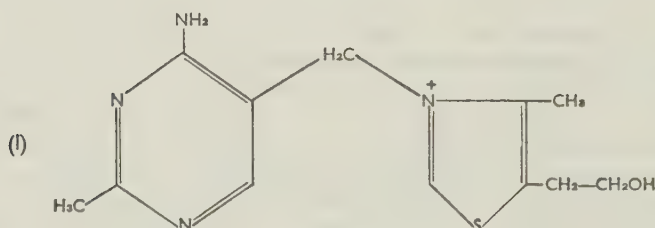
On note également le remplacement du thiazole par la cystéine chez *Bacillus paralvei* (13), *Salmonella typhimurium* (9), un mutant de *Escherichia coli* (17), par l'acide thiazolidine carboxilique-4 d'ailleurs catabolisable en cystéine chez *E. coli* et *N. crassa* (8). Certains composés sulfurés, parfois minéraux, semblent avoir de l'effet (13) (15). Il est difficile de juger du rôle de composés comme $CH_3-CO-CHCl-CH_2-CH_2-CH_2OH$ qui peuvent subir une cyclisation purement chimique.

Quelques modifications de la structure du thiazole (II) conduisent à des corps inactifs, inhibiteurs ou capables de remplacer ce dernier, sans que les implications biogénétiques soient évidentes. (8) (9) (11) (16) (18).

En ce qui concerne la biogénèse de la *pyrimidine*, on a examiné l'action de quelques structures voisines de la pyrimidine sur des organismes capables de faire la synthèse du thiazole. On peut remplacer le méthyle en C₂ par un éthyle (19). On note l'activité des pyrimidines (III, R=CH₂-NH₂, CH₂-OH, CH₂-NH-CHS) sur *Polytoma caeca*, *Chilomonas paramoecium* (20), *S. aureus* (18), de la pyrimidine (III, R=CH₂-O-C₂H₅) sur les plantules de pois (10). Les pyrimidines (III, R=CN, R=CO₂H) ou modifiées par ailleurs sont inactives.

Donc, quand nous avons commencé notre travail, aucun fait expérimental vraiment significatif n'était acquis sur la biogénèse des deux fragments qui se condensent finalement en thiamine. Nous avons pris comme objet de recherches, d'essayer de combler cette lacune en appliquant la méthode des traceurs radioactifs qui s'était déjà révélée si féconde dans les problèmes de biogénèse.

Depuis, une publication (21) a rapporté une expérience faite sur *Bacillus subtilis*; les auteurs ont décelé une incorporation de formiate ¹⁴C dans la thiamine, sans pousser plus loin l'étude du problème.



CHAPITRE I.

CULTURE ET ISOLEMENT

En recherchant dans la littérature les organismes capables de faire la synthèse de la thiamine, on se trouve devant un grand nombre de publications. Près de deux cents espèces ont été examinées. Nous en avons retenu trois : *Mucor racemosus*, *Neurospora crassa*, une *Levure haute de brasserie* (*Saccharomyces cerevisiae*). Nous avons trouvé que toutes trois donnaient des rendements très voisins en thiamine lorsqu'elles étaient cultivées sur les milieux entièrement synthétiques qui convenaient à chacune. Nous avons choisi la levure dont la culture est la plus rapide et la plus reproductible. Le rendement en thiamine est très faible, de l'ordre de $5\mu\text{g}$ par gramme de levure sèche. Nous avons dû envisager l'emploi de précurseurs éventuels doués de la radioactivité spécifique la plus élevée possible. Nous devions donc nous attendre à trouver la thiamine accompagnée d'impuretés très actives. Aussi le problème de la réduction du fond contaminant nous a-t-il retenu longtemps; nous avons cherché à élaborer un compromis entre le rendement et la pureté de la préparation finale.

Pour la culture nous nous sommes inspirés des conditions utilisées pour démontrer l'incorporation de formiate ^{14}C dans les bases puriques de levures (22). La levure haute de brasserie, qui a subi plusieurs cultures successives dans le milieu de THORNE (23), est transférée lorsque commence la fermentation vigoureuse dans un milieu identique contenant en plus le produit marqué dont nous voulons étudier l'incorporation. Il n'est pas nécessaire d'opérer dans des conditions stériles. On recueille après 44 heures les cellules qui ont doublé de poids. Nous extrayons la thiamine comme pour effectuer le dosage standardisé (24), ce qui nous donne une solution très diluée et très impure au pH 5,9. Une première concentration est obtenue par passage sur l'échangeur de cations carboxylique Amberlite IRC-50, dont l'éluat est fractionné sur l'échangeur de cations sulfonique Amberlite IR-120. Il nous faut un acide chlorhydrique relativement concentré pour éluer la thiamine, base quaternaire, de la dernière résine. Cet acide a l'inconvénient bien connu de se concentrer lors de l'évaporation de ses solutions. On utilise à température ordinaire un évaporateur rotatif dont le condenseur est refroidi par de l'air liquide. Ces purifications font perdre environ 15% de la thiamine qui n'est encore qu'un constituant infime de l'extrait sec pesant quelques mg par g de levure sèche.

La chromatographie sur papier de l'extrait avec un solvant connu (26) fournit une tache bien localisée de thiamine révélabale par oxydation en thiochrome intensément fluorescent sous lumière ultra-violette. La mesure de l'activité des bandes successives du chromatogramme, lors de notre première expérience active, nous a montré l'efficacité réelle de cette opération pour purifier la thiamine, mais aussi son insuffisance. La bande vitaminique donne un éluat sec dont le poids est inférieur à 1mg

par gramme de levure sèche et l'entraînement isotopique de la thiamine pouvait y être tenté. C'est ce qui a été fait au cours de notre première expérience active avec le formiate ^{14}C .

Il était très intéressant de se faire une idée sur le genre d'impuretés accompagnant la thiamine jusqu'à ce stade de la concentration. Notre mode de fractionnement doit logiquement concentrer les produits basiques et notamment les acides aminés basiques. Outre les amino-acides libres de la levure, l'extrait peut contenir les produits de dégradation des protéines par les enzymes protéolytiques de la takadiastase utilisée au début de l'extraction (voir la partie expérimentale).

Voici les résultats de l'analyse des amino-acides et bases organiques révélables à la ninhydrine, effectuée avec le concours de M. Paul LEHR suivant une méthode publiée (27) :

a) L'extrait avant chromatographie contient une forte concentration d'acides aminés basiques où domine nettement l'arginine, avec des quantités moindres de lysine et des traces d'ornithine et d'histidine. Sont aussi présents des amino-acides neutres qui se trouvent en grande partie liés, par exemple à des molécules basiques par des liaisons peptidiques; leur concentration augmente en effet après hydrolyse de l'extrait.

b) La bande vitaminique ne contient plus d'amines ni d'acides aminés basiques. En revanche une faible concentration d'acides aminés neutres peut y être décelée. Ce sont par ordre d'importance décroissante : sérine, glycocolle, alanine, valine, leucine, glutamine, thréonine, thyrosine, et à l'état de trace : phénylalanine et méthionine.

Dans cette méthode d'analyse, une électrophorèse sur papier fractionne d'abord les constituants du mélange en grands groupes : acides aminés acides, acides aminés neutres, acides aminés basiques et amines. Sur l'électrophorégramme la thiamine forme une tache bien ramassée entre celle des amino-acides basiques et celle des amines comme la colamine, bien séparée de celle des amino-acides neutres. La bande vitaminique sur le chromatogramme ne contenant que des neutres, l'électrophorèse sur papier à pH 3,9 achève de purifier la thiamine de tout composé révélaible à la ninhydrine. Se trouvent notamment éliminés des contaminants fâcheux comme la sérine dans nos expériences avec le formiate ^{14}C . Sur l'électrophorégramme de notre deuxième expérience avec ce traceur, se trouve en effet une forte zone d'activité au niveau des amino-acides neutres. La répartition de l'activité sur le reste de la feuille montre que le fond contaminant n'est pas complètement éliminé (fig. 2) mais nous nous trouvons dans de bonnes conditions pour faire l'entraînement isotopique et l'isolement définitif. C'est ainsi que l'activité du fond contaminant n'est pas supérieure au quadruple de l'activité qui suit la chimie de la thiamine.



PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE I

CULTURE - On fait plusieurs cultures successives destinées à éliminer la thiamine d'origine extérieure, d'une *levure haute de brasserie* sur le milieu synthétique de THORNE (23) avec comme vitamines : inositol (20 mg/1), pantothénate de calcium (2 mg/1) et biotine (1 mg/1). On centrifuge la dernière culture au moment où commence une fermentation vigoureuse et on transfère les cellules (poids humide : 0,70g) dans 60 cm³ du même milieu avec en plus le produit marqué dont on étudie l'incorporation. L'incubation se fait dans un pot de centrifugeuse de 350 cm³ pendant 44 heures, après quoi on recueille les cellules que l'on lave une fois avec 15 cm³ d'eau (poids des cellules humides : 1,5 g).

EXTRACTION - On transfère les cellules dans un pot de centrifugeuse de 15 cm³ avec de l'eau (5 + 2 cm³); on ajoute de l'acide sulfurique 0,1 n (1,5 cm³) et on porte 15 minutes au bain-marie. Le pH du milieu est alors compris entre 4 et 5, ce qu'on vérifie après refroidissement et sédimentation partielle des cellules par une touche sur un papier indicateur sensible à 0,2 unité de pH; sinon on ajuste le pH avec de l'acide sulfurique 0,1 n ou de l'eau de baryte. Après addition de takadiastase (0,1 g) on abandonne l'extrait une nuit dans une étuve à 37°. Puis on centrifuge et lave le culot avec 3 cm³ d'eau; on ajoute 25 µg de thiamine inactive, ajuste le surnageant à pH 5, 9 avec de l'eau de baryte saturée, sépare le sulfate de baryum par centrifugation. Le surnageant constitue la solution standard où se fait le dosage de la vitamine par fluorimétrie du thiochrome. Il n'aurait ici aucun sens après l'addition d'entraîneur.

ECHANGEURS D'IONS

a) Résine carboxylique Amberlite IRC-50; colonne de hauteur 6 cm, de diamètre 0,6 cm; la résine est sous forme (H); la solution précédente traverse cette solution à raison de 0,5 cm³ par minute; on lave la colonne à l'eau (10-5-5 cm³); on élue la thiamine par C1H n (30 cm³).

b) Résine sulfonique Amberlite IR-120; colonne de 6 cm de hauteur et 0,6 cm de diamètre; la résine est sous forme (H); la solution chlorhydrique précédente traverse cette colonne que l'on lave avec C1H n (60 cm³), puis avec C1H 1,2 n (40 cm³); l'élution de la thiamine se fait avec C1H 3 n (200 cm³); l'éluat est évaporé à sec et le résidu repris par le méthanol.

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER- La solution méthanolique est déposée en bandes de 2 cm sur papier Whatman n° 3; on fait 4 bandes entre lesquelles on partage uniformément par fractions de 75 mm³ les (5 x 0,3 cm³) de la solution méthanolique; entre chacune de ces bandes, on dépose un extrait inactif de levure semblable à l'extrait actif et destiné

à servir de témoins; on dépose aussi à un bout de la feuille une tache de thiamine pure (20 mm³ d'une solution aqueuse à 0,05 %); on développe avec la phase mobile suivante :

n-propanol-eau-tampon acétate molaire (70; 20; 10) pendant environ 24 heures; on révèle la thiamine sur deux témoins et sur la chromatographie de thiamine pure en oxydant en thiochrome par un réactif au ferricyanure de potassium; on obtient une grosse tache de Rf moyen 0,5 et ayant en général une longueur de 4 à 6 cm dans le sens de la migration du solvant; les parties en regard sur les bandes actives et sur les deux témoins restants sont éluées par C1H 0,01 n.

ELECTROPHORESE SUR PAPIER - Chacun des éluats des bandes vitaminiques est déposé sur papier Arches n° 304 en une bande de 5 cm de long; sur une feuille on peut déposer ainsi deux des extraits actifs et un extrait inactif servant de témoin; la feuille est imprégnée de tampon pyridine, acide acétique, eau (30; 100; 4870) à pH 3,9 et placée dans une cuve à électrophorèse en forme de toit (type Durrum); une tension de 380 volts est appliquée pendant deux heures; les témoins sont révélés comme précédemment : la migration de la thiamine, bien ramassée en une petite tache, est de 13 cm. On découpe une bande de 3 cm autour de cette position, qu'on élue avec C1H 0,01 n.



CHAPITRE II.

PREMIERES EXPERIENCES AVEC LE FORMIATE ^{14}C

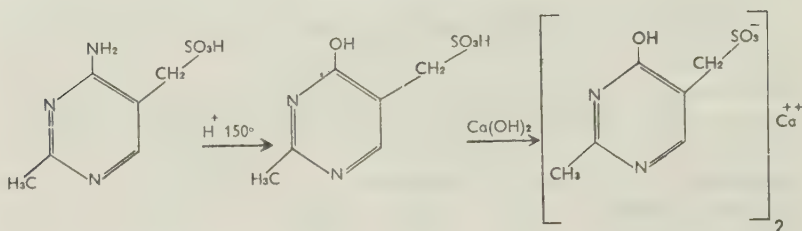
C'est pour essayer de mettre en évidence une incorporation de formiate dans le thiazole de la thiamine que nous avons entrepris la première expérience avec le formiate ^{14}C . Nous pensions à priori que le carbone 2, entre l'azote et le soufre du thiazole pouvait provenir d'une molécule à carbone unique comme le carbone 2 des purines isolé entre deux hétéroatomes.

Une culture de levure haute sur un milieu contenant en plus $150\text{ }\mu\text{C}$ de formiate de sodium ^{14}C fut conduite comme nous l'avons indiqué au chapitre I; la concentration de la thiamine fut poussée jusqu'à la chromatographie sur papier comprise, à l'exclusion de l'électrophorèse qui n'était pas encore au point à ce stade de nos travaux. Après entraînement isotopique dans l'éluat de la bande vitaminique du chromatogramme, la thiamine fut soumise au clivage classique par le bisulfite de sodium. Le noyau thiazole (II) isolé sous forme de picrate après distillation était porteur d'une activité insignifiante.

En revanche le fragment pyrimidique, c'est à dire III ($\text{R}=\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$) entraîna une activité importante.

Il convient de donner ici quelques précisions sur les mesures d'activités spécifiques qui prennent à ce stade de l'expérience et conserveront pendant toute la suite de nos travaux une importance capitale. L'activité spécifique et la quantité des produits dont nous disposerons seront toujours relativement faibles, ce qui nous contraindra à faire les mesures d'activité sur des couches minces. Une certaine masse de produit de l'ordre de 1 à 2 mg est pesée sur une petite cupule en aluminium ou en verre pyrex avec une balance Mettler, sensible au $1/50\text{ mg}$, le dépôt est étalé le plus uniformément possible sur toute la surface de la cupule, à l'aide d'un liquide plus ou moins solvant que l'on évapore soigneusement pour obtenir une couche mince plus ou moins régulière à travers laquelle l'autoabsorption du rayonnement est théoriquement négligeable. Les causes d'erreur et les incertitudes qui en résultent sur la connaissance de l'activité spécifique sont analysées au chapitre III. L'importance des incertitudes dépend d'ailleurs du produit étudié : l'acide sulfonique objet de nos premières mesures qui se présente comme une masse pratiquement amorphe se prête bien à la confection d'une couche mince régulière par étalement de la bouillie qu'il donne dans de l'eau. Sans peine nous avons obtenu des résultats reproductibles pour ce produit.

Nous avons ainsi trouvé que l'activité spécifique entraînée par l'acide sulfonique demeurait constante après plusieurs recrystallisations. Aucune variation n'apparut non plus à la suite de l'hydrolyse acide du dérivé pyrimidique initial que nous avons finalement transformé en sel de calcium suivant le schéma ci-dessous :



Ce sulfonate de calcium, produit neutre, donne aussi des cristaux très fins dans l'alcool et permet la confection de bonnes couches minces. Nous avons mesuré son activité spécifique après dilution par de l'inactif avec un autre compteur sans fenêtre, celui-là, et plus sensible : les valeurs trouvées pour les produits de deux recrystallisations successives sont très voisines l'une de l'autre.

Dans les études de métabolisme par molécules marquées, on considère habituellement que des cristaux qui gardent une activité spécifique constante au cours de plusieurs cristallisations de suite sont purs et portent effectivement cette activité incorporée dans leur molécule. Mais le fragment pyrimidique qui nous intéresse est fortement acide et il s'est formé lors du clivage bisulfite dans un milieu où nos fractionnements successifs avaient concentré les produits basiques de l'extrait de levure. Ces produits constituaient le fond contaminant, quinze fois supérieur à l'activité totale entraînée par la pyrimidine et trois fois supérieur à l'activité maximum que nous pouvions attendre sur la thiamine extraite, en admettant une incorporation à 100 % du formiate sur un carbone du noyau pyrimidique (voir le tableau III en fin de partie expérimentale). Il était à craindre qu'il y ait eu entraînement d'impuretés basiques en cours de cristallisation. La sérine qui a été détectée parmi elles était certainement active dans cette expérience, puisqu'il est bien connu que son carbone 3 peut dériver du formiate. Nous avons donc fait à son sujet une étude : recrystallisant un mélange équimoléculaire de sérine et de pyrimidine III ($\text{R} = \text{CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$), nous avons suivi la sérine dans les diverses fractions par titrage à la ninhydrine; il en ressort que la sérine ne s'associe nullement à l'acide sulfonique, mais que chaque cristallisation abaisse d'environ 90 % la teneur des cristaux en sérine.

D'autres impuretés peuvent se comporter différemment que la sérine en présence de l'acide sulfonique que nous cherchions à purifier. C'est pourquoi nous sommes passés au sel de calcium de l'acide désaminé, produit neutre et avec lequel les dangers d'entraînement se trouvaient

écartés. On peut encore objecter que les cristaux de sel calcique se sont formés dans une solution alcoolique et qu'ils peuvent donc avoir entraîné des impuretés moins solubles dans l'alcool que dans l'eau. Mais il faudrait que ces impuretés soient particulièrement insolubles dans l'alcool pour ne pas subir un fractionnement sensible au cours d'une cristallisation de l'alcool à 60 %.

Une deuxième expérience avec le formiate ^{14}C confirma la première bien que l'isolement et la purification du noyau pyrimidique ait mis en œuvre des dérivés différents. L'électrophorèse ayant été mise au point entre les deux expériences, nous l'avons appliquée à notre extrait de levure. C'est donc sur un concentrat plus pur, l'éluat de la bande électrophorétique, que nous avons fait l'entraînement par de la thiamine inactive. Ne cherchant pas à isoler le thiazole, nous avons dégradé la vitamine par le procédé de ZIMA et WILLIAMS (30) qui libère la pyrimidine sous forme du bichlorhydrate de III ($\text{R}=\text{CH}_2\text{-NH}_2$). Cette méthode qui nous servira plus tard de point de départ pour une dégradation plus poussée, sera exposée en détail au chapitre suivant. Le bichlorhydrate était porteur d'une activité spécifique du même ordre de grandeur que celle trouvée sur l'acide sulfonique de l'expérience précédente.

Ces deux expériences assez significatives nous ont incité à prendre comme hypothèse de travail que la levure peut incorporer le formiate dans le fragment pyrimidique de la thiamine. La suite de nos travaux était ainsi orientée : nous allions avoir à confirmer cette hypothèse par de nouvelles expériences et à localiser éventuellement l'incorporation à l'intérieur du noyau.



PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE II

CULTURE - Elle a été faite suivant le procédé décrit précédemment avec addition dans le milieu de formiate de sodium ^{14}C (150 μC ; 5 mg; 1,6.10 d.p.m.). L'activité du gaz de fermentation est négligeable. La plus grande partie de l'activité se retrouve fixée sur les cellules.

EXTRACTION ET CONCENTRATION - Les opérations de concentration ont été appliquées jusqu'au stade chromatographie sur papier inclusivement. L'activité des différentes fractions a été évaluée; les résultats sont rassemblés dans le tableau I. Le chromatogramme fut découpé en bandes de 4 cm qui furent comptées directement après séchage (fig. I). La bande vitaminique fut éluée par ClH 0,01 n. L'éluat amené à sec, fut repris par de l'eau (1 cm^3), transféré dans un tube de centrifugeuse de 2 cm^3 , où il fut remis à sec au dessiccateur à vide sulfurique.

COUPURE PAR LE BISULFITE DE SODIUM - On ajoute 10 mg de thiamine synthétique, et la solution bisulfite (0,15 cm^3 ; solution commerciale amenée à pH 4,5 par NaOH 3 n); on abandonne trois jours à température ambiante, puis centrifuge et lave le précipité à l'eau (0,1 cm^3) et amène le surnageant à pH 9-10 par NaOH 15 % (0,2 cm^3), puis on l'extrait dans un micro-séparateur (31) avec du chloroforme (1+1+0,5 cm^3). On évapore le chloroforme et distille le résidu dans un tube à boules (E_{boil} : 150-180°, température de bain). On lave la boule récepteur à l'éther (1 cm^3); on ajoute de l'acide picrique (30 mg) dans l'éther (2 cm^3). Après une nuit, on centrifuge, lave à l'éther (2+2+2 cm^3) et sèche sous vide. On obtient ainsi le picrate du méthyl-4 hydroxyméthyl-5 thiazole (4 mg) (activité totale : 1 d.p.m.).

Le précipité centrifugé après la coupure au bisulfite de sodium est constitué essentiellement par de l'acide méthyl-2 amino-4 pyrimidine méthylsulfonique-5, c'est à dire III ($\text{R}=\text{CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$). Il est lavé à l'eau, séché, et compté sur une plaque en pyrex. On recristallise trois fois par dissolution dans NaOH n (0,2 cm^3) et précipitation par de l'acide acétique 2 n (0,2 cm^3). Activités consécutives : 20-21-20 d.p.m./mg.

CONVERSION EN ACIDE METHYL-2 HYDROXY-4 PYRIMIDINE METHYLSULFONIQUE-5 - On réunit les cristaux aux eaux-mères à partir de la deuxième recristallisation et on évapore à sec; puis on chauffe 3 heures en tube scellé à 150° dans ClH concentré (0,1 cm^3); on évapore à sec redissout dans l'eau chaude (0,1 cm^3) et ajoute de l'alcool (1 cm^3); les cristaux apparaissent lentement; on les centrifuge et les lave à l'alcool à 95 % (1 cm^3). Activité : 19 d.p.m.

SEL DE CALCIUM - On dissout un échantillon inactif de l'acide précédent (50 mg) dans l'eau (2 cm^3); on ajoute de l'hydroxyde de calcium (6,5 mg) puis on neutralise à la phénolphthaléine par une solution

de chaux. On évapore à sec, reprend à l'eau (1 cm³). L'addition d'alcool (2 cm³) entraîne une lente cristallisation (51 mg-93 %).

Analyse :	$C_{12}H_{14}N_4O_8S_2Ca$	Calc. %Ca :	9,05
		Tr. %Ca :	9,25

L'acide actif obtenu précédemment (1,17 mg) est neutralisé par une solution n/50 d'hydroxyde de calcium; on lui ajoute du sel de calcium inactif (4,4 mg) et on le recrystallise deux fois dans l'alcool dilué à 60 %. Activités consécutives : 61-63 d.p.m./mg (mesuré avec un compteur sans fenêtre, plus sensible que celui qui nous avait servi pour les mesures précédentes).

Nous avons rassemblé dans le tableau II en fin de chapitre les résultats concernant l'activité entraînée par la thiamine et ses produits de dégradation au cours de l'expérience.

DEUXIEME EXPERIENCE ACTIVE AVEC LE FORMIATE ¹⁴C

CULTURE - Au milieu on a ajouté 175 μ C (5 mg) de formiate¹⁴C.

EXTRACTION ET CONCENTRATION - Toute la série des opérations décrites a été appliquée. L'électrophorégramme découpé en bandes de 3 cm est compté directement après séchage (fig. 2). La bande vitaminique est éluée avec ClH 0,01 n et l'éluat est amené à sec, repris par de l'eau et transféré dans une cupule en pyrex pour y être compté. Activité totale : 750 d.p.m.

DEGRADATION DE LA THIAMINE - Le contenu de la cupule est repris dans l'eau et transféré dans un ballon de 50 cm³. On ajoute 25 mg de thiamine synthétique, de l'eau glacée (0,5 cm³), de la soude n (0,25 cm³) à 0°. On verse goutte à goutte de l'eau oxygénée à 2 volumes (1,75 cm³); on évapore à sec à une température ne dépassant pas 55°; le résidu sec est repris dans 2 cm³ de ClH 2 n; la solution est chauffée 30 minutes au bain-marie puis amenée à sec et reprise par 5 cm³ d'eau; on déminéralise par l'emploi d'une colonne garnie d'Amberlite IR-120 (H) (volume humide : 3 cm³); après passage de la solution sur la colonne, on lave par 70 cm³ d'eau et élue par de l'ammoniaque 2 M (80 cm³). L'éluat amené à sec est repris par ClH n (1 cm³). Après une nouvelle évaporation, le solide est cristallisé de 1 cm³ d'alcool à 96 %. Activité : 11,3 d.p.m./mg.

TABLEAU I

Répartition de l'activité dans les différentes fractions
(concentration de la thiamine; première expérience)

	⁻³ 10 d.p.m.
Total introduit	8000
Activité résiduelle dans le milieu	1600
Cellules après extraction	4000
Effluent et lavage de IRC 50	2300
Eluat de IRC50	25
Effluent et lavage de IR 120	23,8
Eluat de IR 120 (fraction thiamine) calc.	1,2

Ces chiffres obtenus en évaporant à sec et en soumettant au comptage des fractions aliquotes ne donnent qu'un ordre de grandeur. En raison de la présence en quantité importante de produits inertes dans les solutions qui absorbent du rayonnement, les valeurs trouvées ne correspondent pas exactement à une couche mince et sont donc trop faibles.

La fraction thiamine, éluee par CIH 3 n de la résine IR 120 est trop diluée pour qu'on ait pu faire une mesure directe dessus; l'activité portée dans le tableau pour cette fraction a été calculée par différence.

L'abréviation d.p.m. désigne le nombre de désintégrations par minute d'une couche mince enregistrées avec un compteur à fenêtre.



TABLEAU II

Activité entraînée par la thiamine dans l'expérience N° 1
(formiate utilisé à 30 μ C/mg).

Picrate du fragment thiazole	0,2 d.p.m.
Acide méthyl-2 amino-4 pyrimidine méthylsulfonique-5: cristallisation 1	25 d.p.m./mg
« « 2	20 «
« « 3	21 «
en moyenne	4 200 d.p.m./mM
Acide méthyl-2 hydroxy-4 pyrimidine méthylsulfonique-5	19 d.p.m./mg soit 3 880 d.p.m./mM
Poids de diluant : 10 mg de thiamine active	
Activité totale liée à la thiamine	120 d.p.m.
Sel de calcium : cristallisation 1	*61 d.p.m./mg
« « 2	*63 d.p.m./mg

*) L'activité du sel de calcium a été mesurée avec un compteur sans fenêtre plus sensible que le compteur utilisé pour les autres mesures ici rapportées.

TABLEAU III

Activité entraînée par la thiamine dans la deuxième expérience
(formiate utilisé à 35 μ C/mg)

Après concentration par chromatographie	2 140	d.p.m.
Après concentration par électrophorèse	730	d.p.m.
Méthyl-2 amino-4 aminométhyl-5 pyrimidine (bichlohydrate)	11,5 d.p.m./mg soit 2 400	d.p.m./mM

Poids de diluant: 25 mg de thiamine	170	d.p.m.
Activité totale liée à la pyrimidine de la thiamine		



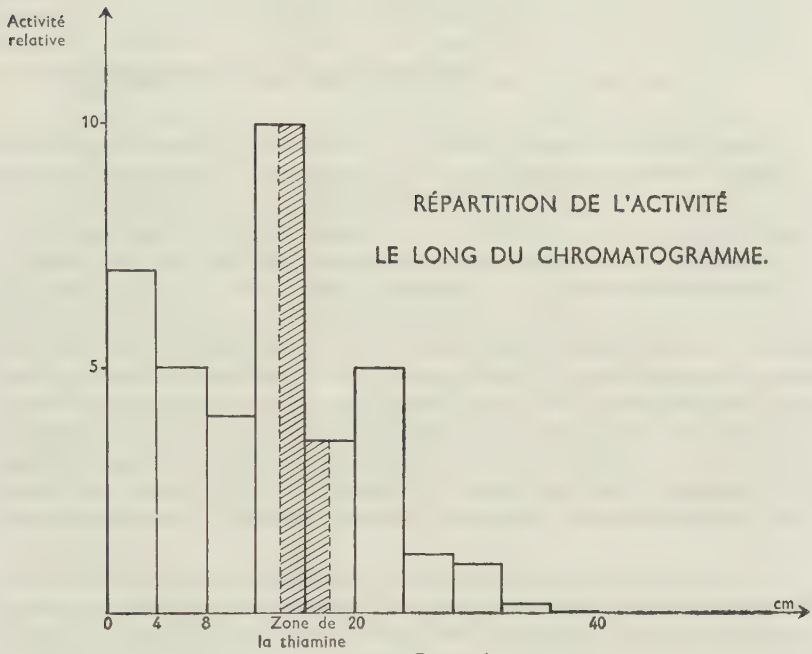


Figure 1

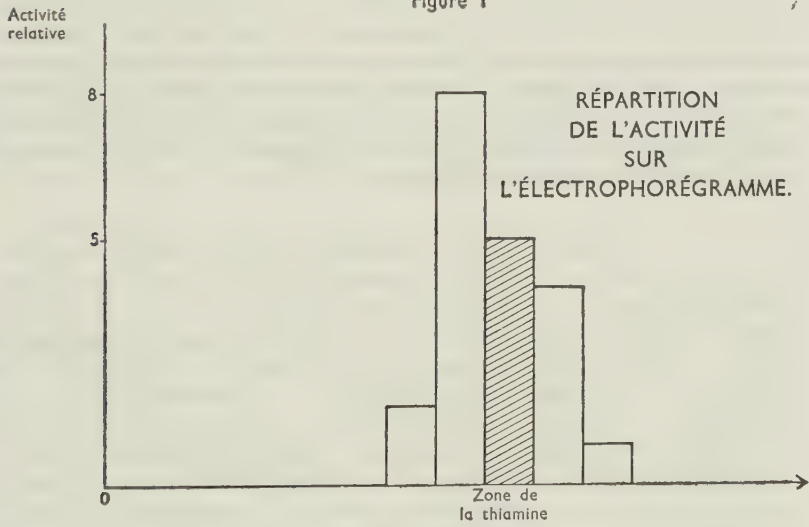


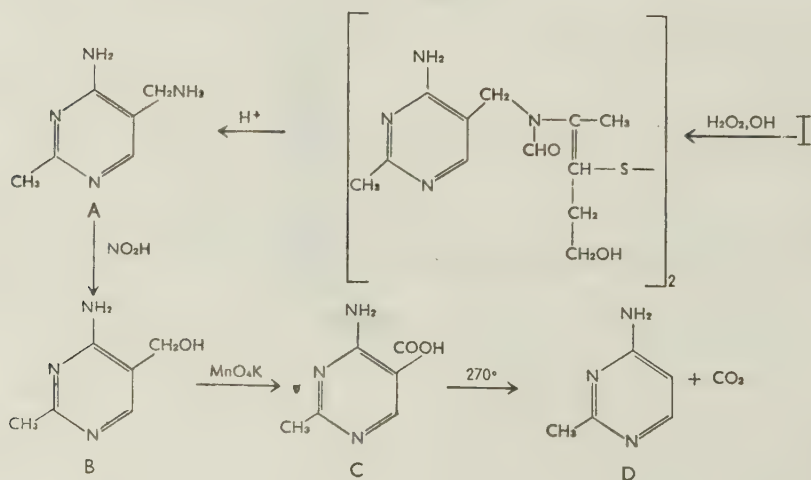
Figure 2

CHAPITRE III.

ETUDE DE L'INCORPORATION DU FORMIATE

Les résultats expérimentaux rapportés au chapitre précédent n'étaient nullement surprenants dans l'état actuel de nos connaissances sur la formation de la molécule de thiamine et sur la biogénèse des pyrimidines dans les nucléotides. Il est établi maintenant que le précurseur immédiat de la thiamine quant à sa partie pyrimidique est la méthyl-2-amino-4-hydroxyméthyl-5 pyrimidine, c'est à dire III ($R=CH_2-OH$), dont l'ester pyrophosphorique se condense dans une dernière étape avec un ester phosphorique du thiazole II (2). Or le formol est précurseur du groupement hydroxyméthyl-5 dans l'hydroxyméthyl-5-cytosine de certains bactériophages (29) dont l'analogie avec la pyrimidine qui intervient dans la biogénèse de la thiamine est frappante. Nous pouvions ainsi préciser notre hypothèse et admettre que l'activité observée dans nos premières expériences avec le formiate ^{14}C était portée par le carbone méthylénique en 5 dans le fragment pyrimidique de la thiamine.

Pour vérifier cette hypothèse il nous fallait une dégradation de la thiamine isolant son méthylène central. Nous avons rapidement renoncé à utiliser le produit pyrimidique du clivage bisulfite comme intermédiaire dans cette dégradation car nous nous étions déjà heurtés à l'extrême stabilité de l'acide pyrimidine sulfonique au cours de la première expérience lorsque nous cherchions à transformer d'une façon ou d'une autre le composé qui entraînait l'activité. Nous avons élaboré une suite de réactions au terme desquelles le méthylène central se trouve séparé sous forme de carbonate de baryum avec un rendement de 40 %. Le principe en est donné dans le schéma ci-dessous :



Toutes les transformations de ce schéma avaient déjà été décrites à l'échelle macrochimique (30) (33) (34) sauf l'oxydation de l'alcool : (B)→(C). Nous avons eu à mettre au point cette oxydation et à adapter les autres réactions à l'échelle semi-microchimique, enfin à rechercher les conditions optimales de la décarboxylation.

La première étape de la dégradation consiste en l'ouverture du cycle thiazole; le traitement alcalin de la thiamine suffit à la provoquer et donne un dérivé où le caractère amide de l'azote primitivement thiazolique est nettement marqué; néanmoins l'hydrolyse de ce corps n'est pas possible car le cycle thiazole et la thiamine se reconstituent par acidification et sont très stables même en milieu très acide. Le chauffage en milieu alcalin en vue de produire l'hydrolyse alcaline amène la formation de produits variés comme thiochrôme et thiazolone par suite d'oxydation difficile à éviter. Nous transformons la thiamine en disulfure pour éviter la recyclisation. L'emploi de l'eau oxygénée limite l'accumulation des ions dans le milieu. La désamination qui suit l'hydrolyse du disulfure et la séparation de la partie thiazolique est le facteur limitant du rendement global de la dégradation : son rendement propre est de 50 % en produit pur; mais elle est indispensable car l'oxydation directe de l'amine ne conduit à aucun produit défini. Celle de l'alcool doit être menée avec soin dans des conditions assez douces car le noyau pyrimidique lui-même peut être oxydé par le permanganate. Enfin lors de la décarboxylation par chauffage l'acide peut sublimer sans altération si l'on ne prend pas de précautions; aussi avons-nous adopté le mode opératoire décrit dans la partie expérimentale où les vapeurs d'acide sont contraintes à passer à travers un bouchon poreux porté à la température de décomposition. Elles se trouvent ainsi maintenues un temps suffisant à la température de décomposition pendant leur migration. Le produit décarboxylé plus volatil est ensuite rapidement entraîné hors de la zone chaude par le courant gazeux et échappe à la décomposition qu'il subirait à son tour s'il y restait plus longtemps.

Ayant bien en main ce moyen de dégradation, nous pouvions entreprendre une nouvelle expérience avec le formiate ^{14}C . Nous en possédions un échantillon spécifiquement cinq fois plus actif que les échantillons précédents, ce qui nous a permis de réduire la quantité de formiate totale et le volume de culture; nous y avons gagné un allègement appréciable des opérations de concentration. Après la dilution isotopique, la thiamine fut soumise à la dégradation que nous venons de décrire. Sans nous soucier d'isoler les intermédiaires, nous avons poussé les opérations jusqu'à l'obtention de l'acide carboxylique (C), dernière étape avant la séparation du carbone supposé actif. Il était intéressant de connaître l'activité entraînée par l'ensemble des carbones pour établir un bilan après leur fractionnement. Grâce à l'emploi d'un compteur sans fenêtre, nous avons pu travailler sur un acide encore une fois dilué isotopiquement par addition d'inactif et manipuler ainsi des quantités commodes de cristaux. Le détail de l'isolement des opérations de cristallisation et de dilution figurent dans la partie expérimentale. Le tableau IV rassemble les valeurs de l'activité trouvée sur les produits des diverses recristallisations successives.

De ce tableau il ressort que comme dans les deux expériences précédentes la partie pyrimidique de la thiamine extraite a entraîné une activité importante. Au cours de la présente expérience nous avons réalisé des conditions assez différentes quant à l'isolement et la purification du produit soumis à la mesure d'activité; les modifications apportées rendaient sans objet les principales critiques que l'on pouvait faire à propos des expériences antérieures.

D'abord chaque étape de la dégradation faisant intervenir des opérations comme le passage sur échangeur d'ions susceptible de fractionner, le fond contaminant de l'acide isolé était probablement moins élevé que celui qui entourait l'acide sulfonique de la première expérience. D'autre part, l'acide (C) est très peu dissocié dans l'eau pure : les risques d'entraînement qu'on pouvait craindre en manipulant l'acide sulfonique étaient totalement inexistants ici. La purification qui précédait chaque mesure d'activité était une recristallisation dans l'eau pure sans intervention d'un non-solvant. Seule l'insolubilité dans l'eau des impuretés contaminantes pouvait mettre l'opération en défaut. A la suite des transformations mises en œuvre par la dégradation, il se peut que certains des compagnons très hydrosolubles de la thiamine se soient retrouvés avec une affinité moins marquée pour l'eau, comme d'ailleurs le noyau pyrimidique objet de notre étude. Mais la masse de ces impuretés était faible, inférieure à 0,2 mg; elles semblent peu susceptibles de perturber plusieurs recristallisations de suite d'une masse d'acide supérieure à 16 mg.

De fait, la première recristallisation a fait baisser de moitié l'activité spécifique des cristaux. Incontestablement des impuretés fortement actives accompagnaient l'acide issu de la dégradation qui ont été efficacement éliminées par la recristallisation. L'effet des opérations suivantes est beaucoup moins marqué. Reproduisons les dernières lignes du tableau :

C ₃	107	d. p. m. /mg
C ₄	97	«
C ₅	85	«
C' ₅	98	«

C₃, C₄, C₅, étant les produits des recristallisations 3,4,5.

Il apparait entre C₃ et C₄ un abaissement d'activité spécifique de 10 % ; entre C₄ et C₅ une différence du même ordre; mais sur les cristaux C'₅ issus de la même cristallisation que C₅ et constituant une autre plaque nous avons trouvé une activité spécifique légèrement supérieure à celle de C₄. Aurions-nous fait d'abord la mesure sur C'₅ que sans la moindre gêne nous aurions estimé être arrivés au terme du fractionnement possible et être en possession de cristaux porteurs d'une activité

spécifique invariable d'une cristallisation à l'autre. Le hasard a voulu que la mesure sur C_5 faite immédiatement après celle sur C_4 semblât accuser une baisse sensible d'activité. Dans l'impossibilité de recristalliser une fois encore la masse des cristaux devenue trop faible nous ne pouvions que refaire une mesure sur ces mêmes cristaux pour essayer de confirmer la première valeur trouvée. Il semble bien que les divergences observées soient imputables à des incertitudes expérimentales qui ont plusieurs origines. L'incertitude statistique est en principe minime puisque pour chaque mesure nous avons enregistré au compteur un nombre d'impulsions voisin de 10 000. Chaque plaque a été soumise à cinq mesures successives dont les résultats extrêmes présentèrent un écart de 5 % : c'est la moyenne de ces résultats qui a été prise comme valeur la plus probable. Les écarts supérieurs à 1 % entre les différentes valeurs et leur moyenne étaient peu nombreux ; leur fréquence n'a guère dépassé la fréquence théorique de $1/3$. Beaucoup plus importante est l'erreur commise sur la pesée des cristaux déposés sur la plaque. L'ouverture de la cage produit un léger déplacement du zéro de la balance dont la stabilité n'est par suite pas assurée à moins de $1/20$ mg près. Une source d'erreur moins facile à chiffrer, c'est l'irrégularité du dépôt de cristaux sur la plaque. Il est particulièrement difficile de réaliser une couche mince avec un produit comme l'acide (C) qui recristallise en gros cristaux à l'évaporation du solvant de dispersion. Deux mesures d'activité sur la même plaque séparées par un essai en vue d'améliorer l'étalement du dépôt ont donné des résultats différant de 12 % ; la valeur la plus forte doit être considérée comme la plus juste car elle correspond à la répartition qui se rapproche le plus de la couche mince. Mais on ne peut être sûr quand on reprend le travail d'étalement d'un dépôt d'agir dans le bon sens aussi est-il difficile de saisir la limite maximum que doit atteindre l'activité manifestée par la plaque. Dans certains cas où la pesée est faite par excès et la répartition sur la plaque est particulièrement mauvaise, les deux causes agissant dans le même sens peuvent entraîner une sous-estimation importante de l'activité spécifique. Ainsi peut s'expliquer l'écart entre C_4 , C_5 et C_3 sans qu'il faille y voir un indice significatif d'un fractionnement d'activité au cours de la recristallisation.

L'activité spécifique de l'acide (C) s'est ainsi fixée à une valeur voisine de 95 d.p.m./mg. A la suite de ces mesures nous disposons d'une quantité de cristaux purifiés trop faible pour poursuivre les purifications et les mesures mais suffisante pour faire la décarboxylation. Les cristaux C_3 , C_4 , C_5 et C_3 déposés sur les plaques furent réunis. Ils donnèrent par décarboxylation du carbonate de baryum parfaitement inactif et une pyrimidine (D) ayant sensiblement la même activité spécifique que l'acide. Une sublimation à une température inférieure à 160° ne modifia pas cette activité. A cause des impuretés actives présentes dans les eaux-mères des diverses cristallisations de l'acide, la décarboxylation du résidu sec de ces eaux-mères nous a donné un carbonate de baryum nettement actif : les contaminants ont pu se décomposer en gaz carbonique actif ou bien étant volatils ont pu être entraînés, captés par la soude et précipités avec le carbonate de baryum. En revanche la pyrimidine (D) issue de l'opération portait la même activité spécifique que l'acide le plus pur et le produit décarboxylé correspondant.

Contrairement à ce que nous imaginions, l'activité entraînée par le fragment pyrimidique de la thiamine n'était donc pas portée par le méthylène substituant la position 5 du noyau. Outre ce résultat négatif que pouvons nous conclure de cette expérience ? Nous l'avions entreprise à la suite de résultats expérimentaux qui se trouvent ainsi pleinement confirmés : une importante activité a suivi le fragment pyrimidique tout au long de ses transformations et purifications comme dans les expériences précédentes où les composés et les moyens de fractionnement mis en œuvre étaient différents. Quantitativement même, les activités trouvées sur les sulfonates dans la première expérience et l'acide (C) sont comparables : rapportée à 100 μ C de formiate 14 C mis dans la culture de levure et à 10 mg de thiamine inactive pour la dilution, l'activité du sel de calcium était de 40 000 d.p.m./mM, celle de l'acide (C) de 75 000 d.p.m./mM. L'ordre de grandeur est le même. On ne pouvait attendre une convergence plus grande de résultats d'expériences où tant de facteurs peuvent apporter des divergences : variations de croissance de la levure, variation du rendement de l'extraction, de la sensibilité du compteur (un an sépare les deux expériences) et surtout, de l'activité spécifique du formiate. Le recouplement des résultats rend un peu plus improbable la présence d'un contaminant qui aurait suivi le fragment pyrimidique sous ses formes variées successives et qui serait porteur de la totalité de l'activité observée; il rend d'autant plus probable l'incorporation réelle de cette activité sur la molécule pyrimidique elle même.

Le carbone actif serait, soit l'un du noyau, soit celui du méthyle substituant en 2 mais certainement pas celui du méthylène substituant en 5. Dans la mesure où l'on peut considérer comme démontrée par l'ensemble de nos expériences l'incorporation de formiate dans le fragment pyrimidique, on peut considérer aussi comme inexacte notre hypothèse initiale : malgré son analogie avec l'hydroxyméthylcytosine, le précurseur de la thiamine, c'est à dire III ($R=CH_2OH$) ne se formerait pas comme elle par fixation de formol en 5. Le carbone méthylénique se trouverait donc en place lors de la cyclisation et le noyau pyrimidique de la thiamine aurait une autre voie biogénétique que les pyrimidines des nucléotides.



PARTIE EXPERIMENTALE

DEGRADATION ISOLANT LE METHYLENE CENTRAL

DISULFURE DE LA THIAMINE - A un mélange d'eau (0,75 cm³) et de soude n (0,5 cm³), refroidi à 0° dans un ballon de 50 cm³, on ajoute la thiamine (bichlorhydrate - 51 mg), puis goutte à goutte, avec agitation, de l'eau oxygénée à 3 volumes, refroidie à 0° (3,5 cm³). On évapore à sec immédiatement à une température inférieure à 55°, et on passe tout de suite à l'étape suivante.

METHYL-2 AMINO-4 AMINOMETHYL-5 PYRIMIDINE (BICHLORHYDRATE) - On ajoute une solution alcoolique 2n d'acide chlorhydrique (4 cm³), de l'eau (0,1 cm³) et on chauffe une demi-heure au bain-marie. On évapore à sec, laisse une nuit au dessiccateur sous vide sulfurique, et on épuise le résidu à l'éther (10+10+10 cm³) en faisant bouillir à reflux un quart d'heure chaque fois.

METHYL-2 AMINO-4 HYDROXYMETHYL-5 PYRIMIDINE
On dissout le solide restant dans l'eau (1,5 cm³), on porte à 60-65°, et on ajoute une solution de nitrite de sodium (0,750 g pour 100 cm³) (1,35 cm³) goutte à goutte avec agitation (25 mm³ par minute). On laisse ensuite une heure à 60°, ajoute de l'eau (5 cm³) et passe sur une colonne de IR-120 (H) (volume humide 4 cm³), on lave la colonne avec 40 cm³ d'eau et on élue la base avec de l'ammoniaque 2M (50 cm³). Par évaporation à sec de l'éluat, on obtient un résidu qui cristallise rapidement.

ACIDE METHYL-2 AMINO-4 PYRIMIDINE CARBOXYLIQUE-5 - Au résidu de l'opération précédente, dissous dans l'eau (11 cm³) et la soude n (0,1 cm³), refroidi à 0°, et agité magnétiquement, on ajoute goutte à goutte (environ 0,1 cm³/minute), du permanganate n/20 (19 cm³). A la fin on ajoute de la soude n (0,4 cm³). Le lendemain on achève la floculation du bioxyde de manganèse en maintenant quelques minutes au bain-marie, on détruit éventuellement l'excès de permanganate par quelques gouttes d'eau oxygénée à 2 volumes et on centrifuge. On fait passer le surnageant sur une colonne IRA 410 (OH) (volume humide 2,5 cm³). On lave à l'eau (50 cm³) et on élue l'acide avec de l'acide acétique 2M (40 cm³). Après évaporation à sec, on recrystallise le résidu dans l'eau (0,8 cm³). Poids : 5 mg-F=270°. Les eaux-mères contiennent encore de l'acide (6,5 mg-F=270°). Rendement par rapport à la thiamine : 45-50 %.

METHYL-2 AMINO-4 PYRIMIDINE - Dans le tube à combustion d'un appareil à semi-microanalyse, on met l'acide (10-20 mg) dans la nacelle de platine, et à 6 cm en aval un tampon de laine de verre. On purge l'appareil par un courant d'hydrogène décarbonaté que l'on maintient ensuite pendant toute l'opération, et qui passe dans un barboteur à soude (0,2 n-5 cm³) à la sortie de l'appareil. On chauffe le tampon de

laine de verre à 400° puis on déplace le tube de façon que nacelle et tampon soient bien tous les deux dans la région centrale du four et portés chacun à 400°. Après deux à trois minutes, on observe une sublimation avec condensation annulaire dans la partie du tube extérieure au four. On poursuit le chauffage pendant 6 minutes.

On précipite le gaz carbonique par addition de Cl_2Ba 0,1 M dans le barboteur. Le carbonate de baryum est centrifugé en tube bouché, lavé à l'eau et séché sur P_2O_5 .
Rendement : 90 %.

On dissout dans l'acétone l'anneau sublimé et on obtient par évaporation du solvant des cristaux de méthyl-2 amino-4 pyrimidine (65 %) $F=205-206^\circ$.

Lors d'essais à plus grande échelle, suivant le même mode opératoire, nous avons isolé et purifié les intermédiaires suivants et constaté leur identité avec les produits authentiques :

méthyl-2 amino-4 aminométhyl-5 pyrimidine (bichlorhydrate)

$F = 255^\circ$ (Koffler), inchangé par mélange avec un échantillon authentique (Hoffman-La Roche).

Spectre UV (inédit) dans ClH 0,01n : $\lambda_{\text{max}} = 245 \text{ m}\mu$
 $\varepsilon_{\text{max}} = 12000$

méthyl-2 amino-4 hydroxyméthyl-5 pyrimidine -

Recristallisé dans l'isopropanol $F=195-196^\circ$ (Koffler).

acide méthyl-2 amino-4 pyrimidine carboxylique-5 -

$F = 270-272^\circ$ (capillaire) après recristallisation dans l'eau, inchangé par mélange avec un échantillon préparé selon (38). Il y a également identité des spectres UV (inédits) en milieu acide et alcalin

dans ClH 0,1 n : $\lambda_{\text{max}} = 247 \text{ m}\mu$ $\varepsilon = 13\ 000$
dans NaOH 0,01n : $\lambda_{\text{max}} = 245 \text{ m}\mu$ $\varepsilon = 11\ 000$

méthyl-2 amino-4 pyrimidine -

$F=205^\circ$ (capillaire); non changé par mélange avec un échantillon préparé selon Foeldi (39).

Spectre UV dans l'eau : $\lambda_{\text{max}} = 240 \text{ m}\mu$ $\varepsilon = 11\ 000$

TROISIEME EXPERIENCE ACTIVE

CULTURE - Nous disposions de formiate d'activité spécifique beaucoup plus forte (250 μ C; 1,6 mg; 10 mC/mM). En conséquence nous avons réduit le volume des cultures : milieu : 25 cm³ avec le même mode opératoire que précédemment.

Poids de levure humide total : 0,42 g

Poids de levure humide qui s'est développée sur le milieu actif : 0,24 g.

EXTRACTION ET CONCENTRATION DE LA THIAMINE -

Les mêmes colonnes que précédemment ainsi que les mêmes volumes de lavage et d'éluant ont été employés. La chromatographie sur papier a été faite sur seulement deux bandes de papier de 4 cm, ainsi que l'électrophorèse.

DEGRADATION - Après dilution de l'éluat de l'électrophorogramme par 50 mg de thiamine inactive, la dégradation décrite dans ce chapitre fut appliquée. On obtient des cristaux d'acide méthyl-2 amino-4 pyrimidine carboxylique- 5 (C). La recrystallisation de C1 donne C2.

Activité spécifique mesurée avec un compteur à fenêtre :

C1 25 d.p.m./mg

C2 12 d.p.m./mg

Avant de pousser plus loin la purification nous procédons à une dilution isotopique de l'acide. On entraîne l'activité dans les eaux-mères de C1 et de C2 par 2 fois 8 mg d'acide inactif; les cristaux résultant sont recrystallisés une fois dans l'eau. Le produit obtenu est mélangé aux cristaux C2 et l'ensemble est recrystallisé une fois : on obtient C3; les recrystallisations de C3 donnent C4 puis C5.

Le tableau IV ci-dessous rassemble le résultat des mesures sur ces différents cristaux avec un compteur sans fenêtre.

TABLEAU IV

	dpm/mg	dpm/mM
C3	107	16 380
C4	97	14 840
C5	85	13 000
C'5	98	14 990
(autre plaque)		

On rassemble C3, C4, C5 déposés sur les plaques de mesures et les soumet à la décarboxylation. Le carbonate de baryum est inactif. Le sublimat de méthyl-2 amino-4 pyrimidine (D) est extrait du tube à réaction par de l'acétone. L'évaporation de ce solvant dépose des cristaux (D1). Ces cristaux sont resublimés sur une plaque de verre chauffée à une température contrôlée par la platine d'un appareil Koffler; la température ne dépasse pas 160°; le sublimat est recueilli sur les parois d'un petit godet en pyrex renversé sur la plaque de verre. Il constitue les cristaux (D2).

Le même traitement est appliqué à l'acide saturant les eaux-mères de C2, C3, C4 et C5. Le carbonate de baryum est actif : 8000 dpm/mM. La pyrimidine sublimée à la suite de la décarboxylation est D'1. Sa resublimation donne D'2.

Le tableau V ci-dessous rassemble le résultat des mesures d'activité faites sur les différents cristaux de pyrimidine décarboxylée.

TABLEAU V

	dpm/mg	dpm/mM
D1	124	13 460
D2	128	13 950
D'1	139	15 230
D'2	137	15 000



CHAPITRE IV.

EXPERIENCE AVEC L'ACIDE OROTIQUE 4-¹⁴C.

A la suite de nos tout premiers résultats expérimentaux, nous avons renoncé à notre idée primitive d'étudier la biogénèse du thiazole pour nous attacher à celle de la partie pyrimidique. Sur la lancée de ces résultats nous avons poussé l'étude des relations biogénétiques de cette pyrimidine avec le formiate; elle fait l'objet des précédents chapitres. Mais l'idée qui s'impose à priori quand on s'attaque au problème de sa biogénèse, c'est d'étudier les relations entre la pyrimidine de la thiamine et les pyrimidines des nucléotides dont on connaît avec certitude les précurseurs. Ainsi avons-nous entrepris tout en poursuivant nos travaux sur l'incorporation du formiate une expérience avec de l'acide orotique marqué, l'acide orotique étant un précurseur commun à toutes les bases pyrimidiques des nucléotides. (22) (35) (37).

Culture et extraction furent conduites comme dans les expériences précédentes mais nous avons trouvé une répartition toute différente de l'activité dans les diverses fractions qui apparaissent au cours des opérations : l'acide orotique s'incorpore très mal dans la levure; une faible partie de l'activité seulement est passée dans les cellules pendant le développement de la levure.

L'acide pyrimidique sulfonique issu du clivage bisulfite de la thiamine extraite et diluée par de l'inactive n'a présenté aucune activité mesurable dès sa première précipitation.

Ce résultat net ne permettait pas à lui tout seul de tirer une conclusion catégorique. La levure produit très peu de vitamine et incorpore très mal l'acide orotique extérieur; le résultat négatif obtenu n'est pas incompatible avec une filiation même assez directe de l'acide orotique et de la pyrimidine qui, en raison de la mauvaise assimilation de l'acide orotique extérieur, n'aurait entraîné qu'une activité indécélable par notre compteur peu sensible. A titre de comparaison nous avons mesuré l'activité incorporée dans l'uracile et la cytosine. L'isolement de ces bases pyrimidiques est décrit dans la partie expérimentale. Le mode opératoire adopté a été inspiré par ceux décrits dans l'ouvrage de CHARGAFF (36) sur les acides nucléiques. Les acides ribonucléiques ont été extraits sur le résidu cellulaire ayant déjà subi l'extraction à l'eau. Ces acides nucléiques furent hydrolysés dans des conditions assez dures pour libérer les bases pyrimidiques. Une chromatographie sur échangeur d'ion nous a ensuite permis de séparer uracile et cytosine à l'état pur. Il fut aisé de mettre en évidence la forte activité spécifique portée par ces deux bases grâce à la reproductivité parfaite des mesures beaucoup moins délicates que les mesures sur des produits de faible activité spécifique que nous avons eu à faire jusque là. L'uracile s'est révélé cent fois moins actif que l'acide orotique initial; la cytosine

presque trois fois moins active que l'uracile. Une incorporation de la même importance dans la thiamine se serait traduite par la présence de 10 dpm au plus sur l'acide sulfonique. C'est à peu près la valeur du mouvement propre de notre compteur : cette activité pouvait donc être mesurée sans difficulté; nous pouvions encore mesurer une activité moitié et détecter 1 à 2 dpm. Le résultat obtenu signifie que le taux d'incorporation de l'acide orotique dans la pyrimidine de la thiamine est inférieur au cinquième de ce qu'il est dans l'uracile. Ce résultat était prévisible car si la pyrimidine de la thiamine se rattache biogénétiquement à l'acide orotique, elle en représente une modification plus poussée que l'uracile et la cytosine. La valeur démonstrative de cette expérience est donc assez limitée.

Il faut en retenir cependant que l'acide orotique se prête mal à l'étude que nous avons en vue parce qu'il est mal assimilé par la levure; l'emploi d'un autre métabolite biogénétiquement voisin mais facilement assimilable doit être envisagé.



PARTIE EXPERIMENTALE

CULTURE - Elle fut faite suivant le mode opératoire décrit sur 60 cm³ de milieu avec addition d'acide orotique 4- ¹⁴C (100 μ C; 5,2 mg).

EXTRACTION ET CONCENTRATION DE LA THIAMINE - Au terme de la série complète des opérations, le concentrat obtenu est dilué isotopiquement par 5 mg de thiamine inactive. Le tableau VI rassemble les valeurs des activités entraînées par les différentes fractions apparues en cours de concentration.

CLIVAGE BISULFITIQUE - La thiamine est mise en tube à centrifuger de 1 cm³ où l'on ajoute 0,15 cm³ de solution bisulfitique (solution commerciale de bisulfite de sodium amenée à pH 4,5 avec Na OH 3n). Au bout de deux jours on centrifuge, prélève le surnageant on lave le précipité avec 0,1 cm³ d'eau, sèche sous vide. Sur une plaque portant la totalité de l'acide sulfonique nous n'avons décelé aucune activité.

EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES - le résidu cellulaire est mis en suspension dans 3 cm³ d'eau glacée; on ajoute goutte à goutte 0,75 cm³ de NaOH à 40 % également refroidie à 0° et laisse reposer 90 minutes; on ajuste alors à pH 6-7 avec de l'acide acétique pur (0,5 cm³) et centrifuge. Le surnageant est acidifié avec environ 0,6 cm³ de ClH concentré jusqu'à pH 3 puis dilué par un volume égal d'alcool à 96°. Après un séjour d'une nuit au réfrigérateur, le tube est centrifugé; le culot est lavé à l'alcool et séché sous vide. Poids de l'extrait : 8mg.

Nous avons dosé le ribose à l'orcinol dans un extrait de la même façon à partir d'une levure inactive. Le témoin étant une solution d'acide nucléique Merck, nous avons trouvé une pureté de 60 %.

HYDROLYSE - Les acides nucléiques sont mis dans une ampoule où l'on ajoute 1 cm³ d'eau et 2 cm³ de ClH concentré; l'ampoule est scellée et maintenue à 170° pendant 3 heures.

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ECHANGEUR D'IONS AMBERLITE IRA 410 - La colonne a les dimensions suivantes: 13 cm de long et 0,48 cm² de section; la granulométrie est de 0,07-0,197 mm. L'hydrolysate est repris par 5 cm³ de solution tampon (T). Après filtration on le fait passer sur la colonne sous forme (C1); l'élution est faite avec de la solution (T) : AmOH 0,2M - ClAm (0,025 M) à pH 10,6. On maintient un débit de 0,1 cm³ par minute et collecte les fractions de 10 cm³ que l'on examine au spectrophotomètre à 260 m μ . La cytosine passe dans les fractions 2 et 3; l'uracile dans les fractions 38 à 46. Nous avons vérifié au cours d'une expérience inactive par chromatographie sur papier avec comme solvant le mélange isopropanol-ClH-eau (170-41-39), élution des bandes successives et examen spectrophotométrique à 260 m μ , l'identité et la pureté des deux bases ainsi séparées.

ETUDE DE L'URACILE - Les fractions 38 à 46 sont réunies, concentrées jusqu'à 25 cm³; la densité optique de cette solution correspond à une masse totale d'uracile de 0,7 mg. On amène la solution à sec, la reprend par 25 cm³ d'eau, la déminéralise par absorption sur Amberlite IRA 410 (OH) et élution par de l'acide acétique 2M. L'éluat est amené à sec et le résidu transféré dans un tube de 3 cm³, dilué par 10 mg d'uracile inactif et cristallisé dans 1 cm³ d'eau deux fois. Les activités spécifiques mesurées avec le compteur à fenêtre sont : 1400-1390 dpm/mg.

ETUDE DE LA CYTOSINE - Les fractions 2 et 3 sont réunies et amenées à sec; on déminéralise par passage sur Amberlite IR 120 (H) et élution par AmOH 2M (30 cm³) le dosage spectrophotométrique à 270 mμ est fait sur cet éluat : 0,4 mg au total. On dilue par 10 mg de cytosine inactive et cristallise dans 1 cm³ d'eau.

Activités spécifiques : 280- 286 dpm/mg.



TABLEAU VI

Répartition de l'activité (Expérience à l'acide orotique)

	10^{-3} d.p.m.
Total introduit	5300
Effluent et lavage de IRC 50	240
Cellules après extraction	110

Acide orotique du milieu	160 000 d.p.m./mM	
Uracile	2 400	«
Cytosine	810	«
Thiamine	0	



CONCLUSION.

Ayant commencé nos recherches dans un domaine encore totalement inexploré nous avons rencontré outre les difficultés propres au sujet, une incertitude de départ : aucune donnée expérimentale ne pouvait guider nos premiers pas. Faire un peu au hasard notre première expérience nous a fait renoncer à notre idée initiale d'étudier le thiazole de la thiamine mais nous a permis d'observer les premiers l'incorporation du formiate dans le fragment pyrimidique*. L'inactivité concomitante du thiazole constitue un fait moins exploitable mais solidement établi par comparaison avec la forte activité de l'autre fragment.

Ces résultats ont orienté nos efforts; leur utilisation nous a longtemps retenu. Aussi n'avons-nous pu qu'ébaucher l'étude directe des relations biogénétiques de la thiamine avec les pyrimidines des nucléotides. Nous apportons néanmoins une indication : s'il y a incorporation d'acide orotique dans la thiamine, elle est au moins cinq fois plus faible que dans l'uracile.

La purification de la thiamine extraite a fait l'objet de nombreux tâtonnements : mettant à profit les indications données par la répartition de l'activité au cours des expériences successives, nous avons perfectionné peu à peu les opérations de purifications pour avoir finalement en main un procédé efficace qui débarrasse la thiamine d'un grand nombre de contaminants. Ce procédé a été mis à l'épreuve dans des conditions très sévères de contamination réalisées par l'incorporation du métabolite très élémentaire qu'est le formiate; il conservera toute son efficacité dans les études qui pourront être faites à l'avenir avec des métabolites marqués plus particuliers.

Le cours de notre travail nous a conduit à mettre au point une dégradation chimique de la thiamine isolant son méthylène central et son noyau pyrimidique à l'échelle semi-microchimique. Elle constitue aussi un outil efficace au service des recherches futures sur ce sujet.

Les principales difficultés qui ont rendu malaisé l'emploi du traceur radioactif venaient du fait que la levure synthétisant peu de vitamine B₁, une faible activité seulement était liée à la thiamine. Il en résultait une gêne à la purification finale dont nous devons réduire l'efficacité pour conserver une masse manipulable de produit et une activité mesurable. Une discussion délicate s'est souvent révélée nécessaire pour permettre d'apprécier la valeur des résultats. Les travaux ultérieurs pourront seuls apporter la confirmation définitive; mais les faits que nous avons rappor-

*) Résultat indiqué verbalement par le Professeur DAVID au Congrès international de biochimie de Vienne au cours de la discussion qui a suivi l'exposé du Professeur H.G.K. WESTENBRINK sur le métabolisme de la thiamine et enregistré par les soins du président de séance, le professeur UMBREIT (mardi 2 septembre 1958).

tés sont assez solidement établis par l'ensemble des recoupements que nous avons recherchés pour que nous dégagions les conclusions biogénétiques inattendues qui en découlent.

L'inactivité du méthylène central à côté de l'activité sensible du noyau pyrimidique dans l'expérience avec le formiate ^{14}C exclut la filiation de la thiamine avec les bases pyrimidiques des nucléotides. Le noyau de la thiamine ne provient pas d'une transformation de l'acide orotique; sa formation fait intervenir la cyclisation d'une chaîne qui doit apporter en particulier le carbone substituant en 5.

La détermination du carbone porteur de l'activité observée éclaircira le problème en permettant de choisir parmi les schémas de biogénèse que l'on peut imaginer.

Notre travail se trouve ainsi à la base d'une hypothèse de départ bien fondée. Il ouvre largement la voie aux recherches futures sur la biogénèse de la thiamine.



BIBLIOGRAPHIE.

- 1 - F. KORTE, H. WEITCAMP
Les mêmes avec J. VOGEL
Ann. Chem. 1959, **622**, 121
ibid. 1959, **628**, 158
- 2 - D.L. HARRIS, J. YAVIT
I.G. LEDER,
G.W. CAMIENER, G.M. BROWN,
Y. NOSE, K. UEDA, T. KAWASAKI
J. SUZUOKI, A. KOBATA
Feder. Proced. 1957, **16**, 192.
ibid. 1959, **18**, 270
et Biophys. biophim. research Comm.
1959, **1**, 63.
J. biol. chem., 1960, **235**, 2404-10.
Biophy. biochim. Acta, 1959, **34**, 277
J. Biochem. (Japon), 1960, **47**, 262.
- 3 - K. YAMADA, S. SAWAKI, S. HAYAMI
J. Vitaminol. 1957, **3**, 73.
- 4 - S. FUKUI, T. KISHIBU,
J. Fermentation Techn. (Japon)
1951, **29**, 94.
- 5 - C.O. DOUDNEY, R.P. WAGNER
Proc. Natl. Acad. Sc. US, 1953, **39**,
1043.
- 6 - S. FUKUI,
J. Fermentation Techn. (Japon)
1950, **28**, 98.
- 7 - S. HIBINO, R. TAKATA
ibid., 1950, **28**, 262.
- 8 - T. WATANABE
J. gen. Microbiol., 1960, **22**, 102
- 9 - H. NAKATAMA,
Vitamins, (Japon), 1956, **11**, 169
- 10 - J. BONNER, E.R. BUCHMAN
Proc. natl. Acad. Sc. US., 1938, **24**, 431.
- 11 - E.R. BUCHMAN, E.M. RICHARDSON
J. amer. chem. Soc., 1939, **61**, 891.
- 12 - E.L. TATUM, T.T. BELL
Amer. J. Botany, 1946, **33**, 15.
- 13 - H. KATZNELSON
J. biol. Chem. 1947, **167**, 615.
- 14 - H.J. DEBEY, J.B. et C.G. MACKENSIE
J. Nutrition, 1958, **66**, 607.
- 15 - Z. SATOH
Vitamins, (Japon) 1952, **5**, 589.
- 16 - H. NAKAYAMA
Vitamins, (Japon) 1956, **10**, 356.
- 17 - id.
ibid., 417.
- 18 - B.C. KNIGHT, H. Mac ILWAIN
Biochem. J., 1938, **32**, 1241.
- 19 - W.H. SHOPPER
Ann. Ins. Pasteur, 1938, **61**, 781.
- 20 - A. LWOFF, H. DUSI
C.R. Soc. Biol., 1938, **127**, 1408.
- 21 - M.J. PINE, R. GUTHRIE
J. Bacteriol., 1959, **78**, 545.
- 22 - J.M. EDMONDS, A. DELLUWA,
W. WILSON
J. biol. Chem., 1952, **197**, 251.
- 23 - R.S.W. THORNE
J. Inst. Brewing, 1949, **55**, 18.

- 24 - The Analyst, 1951, **76**, 127.
- 25 - J.E. VINCENT Rec. Trav. chim. Pays Bas, 1957,**76**, 780.
- 26 - D.N. SILIPRANDI Biochim. Biophys. Acta, 1954, **14**, 52.
- 27 - G. BISERTE, P. BOULANGER, P. PAY-SANT Bull. Soc. Chim. biol., 1958, **40**, 2067.
G. BISERTE, T. PLAQUET-SCHOONART
P. BOULANGER et P. PAYSANT J. Chromatog., 1960, **3**, 25.
- 28 - R.R. WILLIAMS, R.E. WATERMAN, J.C. KERESZTESY et E.R. BUCHMAN J. amer. chem. Soc., 1935, **57**, 536.
- 29 - J.G. FLAKS, S.S. COHEN Biochim, Biophys. Acta, 1957, **25**, 667
- 30 - O. ZIMA, R.R. WILLIAMS Ber., 1940, **73**, 947.
- 31 - B.L. BROWNING Mikrochem., 1939, **26**, 54.
- 32 - R.R. WILLIAMS, E.R. BUCHMAN, A.E. RUEHLE J. amer. chem. Soc., 1935, **57**, 1093.
- 33 - H. ANDERSAG, K. WESPHAL Ber., 1937, **70**, 2048.
- 34 - TAIZO MATSUKAWA, BUHACHIRO OHTA J. pharm. Soc. Japan, 1950, **70**, 238.
et Chem. Abstr., 1951, **45**, 2895, d
- 35 - C.E. CARTER Annual Rev. Biochem., 1956, **25**, 124.
- 36 - E. CHARGAFF, JN. DAVIDSON The nucleic acids, vol. I
Academic Press, New-York, 1955.
- 37 - J.B. HALL, F.W. ALLEN Biochim, Biophys. Acta, 1960, **39**, 557
- 38 - A. TODD, F. BERGEL J. chem. Soc., 1937, 364.
Z. FOELDI, A. SALOMON Ber., 1941, **74**, 1128.
- 39 - Z. FOELDI, G. von FODOR, I. DEMJEN
H. SZEKERES, I. HALMOS Ber., 1942, **75**, 755.



II^{me} THÈSE : Proposition donnée par la Faculté.
Les matériaux thermoélectriques modernes;
Applications récentes de la thermoélectricité.

Vu et Approuvé
Nancy, le 9 Juillet 1962

Le Doyen:
M. ROUBAULT

Pour le Doyen
L'assesseur délégué:
signé illisible

Vu et Permis d'Imprimer
Nancy, le 10 Juillet 1962
Le Recteur
Président du Conseil de l'Université
P. IMBS

IMPRIMERIE LÉON LOUIS & Cie
BOULAY-MOSELLE
2-1647

Dépôt légal n° 16
4° trimestre 1962

